

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Kegiatan penelitian dilakukan pada bulan Desember 2019 sampai Desember 2019 yang bertempat di Lab Kultur In Vitro Pusbang Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 3.2 Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas piala, beaker glass, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur; alat-alat diseksi: scallpel, pinset, gunting, *Laminair Air Flow Cabinet*, timbangan analitik pipet, alat sterilisasi: autoklaf, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*), pH meter, lemari pendingin, rak kultur, alat pemotret, thermometer, lampu fluorescence, lux meter, kertas label, hot plate, kertas tissue, korek, plastik, karet, stirer dan planlet.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan stok makronutrien medium MS, larutan stok mikronutrien medium MS, larutan stok sumber besi, Manitol (Widoretno, 2004), aquades steril, agar, larutan stok organik yaitu sukrosa, vitamin, asam amino, bahan sterilisasi yaitu alkohol 70%, spiritus, tepol, detergen Sunlight, dan Sunclin 20%. Bahan buffer pH: NaOH 0,1 N dan HCl 0,1 N.

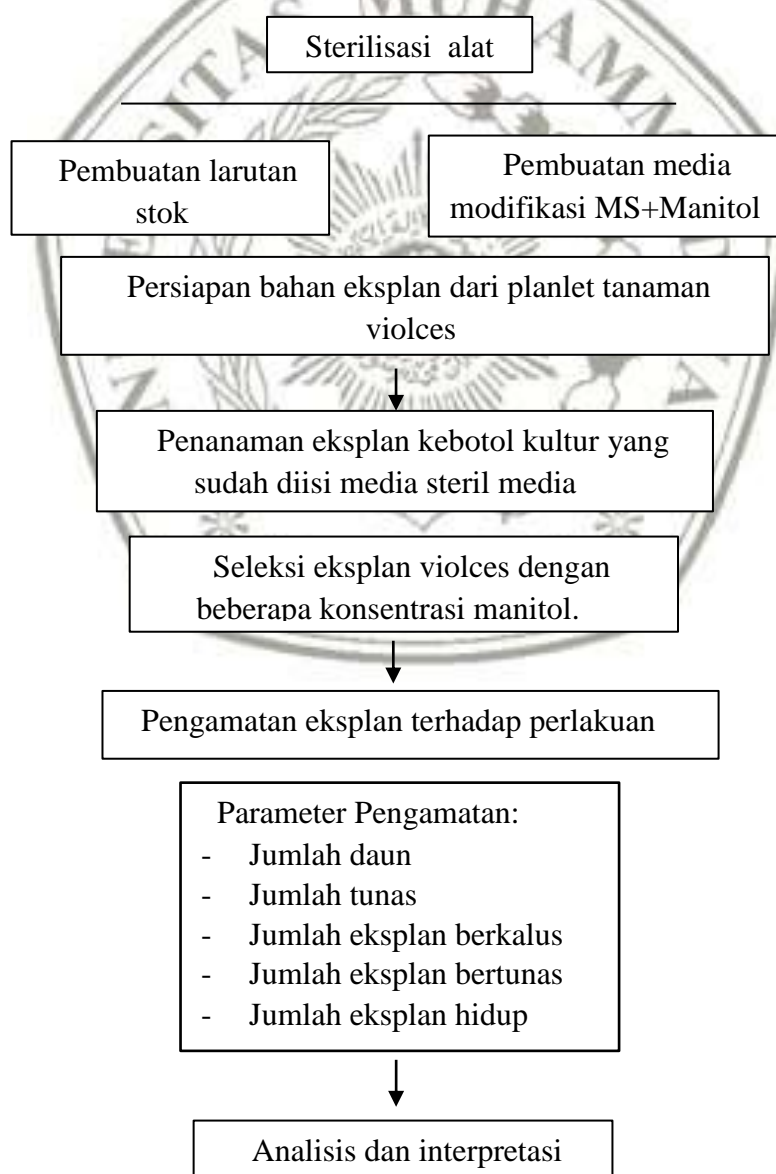
#### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 5 konsentrasi yaitu manitol 0 g, manitol 10 g, manitol 20 g, manitol 30 g, manitol 40 g, manitol 50 g. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali ulangan, 6 kombinasi perlakuan 4 kali ulangan tiap botol di beri kode

M=manitol, 0=g, U1 = ulangan 1, 2, 3, 4 (M0 U1, M0 U2, M0 U3, M0 U4) tiap perlakuan ada 4 botol, dan tiap botol isi 10 eksplan, di bagian bawah botol sejajar dengan letak penanaman eksplan di beri kode 1-10 sebagai tanda sampel, sehingga Total botol 24 botol, dan total eksplan 240

### 3.4 Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:



Gambar 1 Diagram Alur Penelitian

### 3.4.1 Persiapan Daun *Violces* Untuk Dikulturkan

Eksplan yang akan digunakan adalah organ daun *violces* yang telah disediakan di lab kultur in vitro, kemudian di subkulturkan kedalam media perlakuan .

### 3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses persiapan dan sterilisasi alat yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan botol kultur dan alat yang akan digunakan yaitu, cawan petri, scalpel, dan pinset.
2. Mencuci bersih botol dan alat-alat dengan menggunakan sabun cuci, lalu di keringkan.
3. Merendam botol menggunakan Clorox dan air selama 24 jam, kemudian alat di keringkan dengan memasukkan ke dalam oven selama  $\pm 1$  jam.
4. Sterilisasi alat berupa petridish, scalpel, dan pinset dan gunting dilakukan dengan membungkus dengan kertas dan dimasukkan kedalam plastik lalu diikat dengan karet.
5. Menyiapkan autoclaf dan meletakkan semua alat-alat yang akan disterilisasi.
6. Mengatur suhu  $212^{\circ}\text{C}$  selama 60 menit
7. Mengeluarkan alat-alat dan diletakkan pada ruangan yang steril, selanjutnya alat siap untuk digunakan.

### 3.4.3 Pembuat Larutan Stok

Proses pembuatan larutan stok yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat dan bahan (unsur makro dan mikro komposisi media MS) yang akan digunakan.
2. Menghitung dan menimbang masing-masing bahan komposisi media MS.
3. Mengencerkan bahan yang sudah di timbang dengan aquades sesuai kebutuhan.
4. Mengaduk larutan sampai homogen.
5. Memasukkan dalam botol dan diberikan label pada tiap botolnya lalu simpan di dalam refrigerator (agar larutan tetap awet).

**Gambar 2. Pembuatan Stok MS**



1. Menimbang Bahan Stok MS



2. Memasukkan Bahan Stok kedalam Botol



3. Menambahkan Aquades Steril



4. Menghomogenkan hingga larut

#### **3.4.4 Pembuatan Media Murashige & Skoog (MS) dan Penambahan Senyawa Manitol**

Proses pembuatan media MS dan penambahan manitol yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat dan bahan yang akan digunakan.
2. Memasukkan komposisi media MS sesuai kebutuhan dengan tambahan zat pengatur tumbuh BAP sebanyak 2 mg.
3. Menimbang sukrosa 18 g, agar 4,2 g dan manitol yang akan digunakan sesuai dengan perlakuan konsentrasi manitol. M0 = 0 g, M10 = 10 g, M20 = 20 g, M30 = 30 g, M40 = 40 g, M50 = 50 g.
4. Memasukkan larutan stok menggunakan pipet ukur ke dalam beker glass.
5. Menambahkan sukrosa dan manitol sesuai dengan konsentrasi.
6. Menambahkan aquades sampai 600 ml.
7. Menentukan pH menggunakan kertas lakmus sampai pada pH 5,8 dengan menambahkan NaOH untuk menaikkan pH dan HCl untuk menurunkan pH.
8. Menambahkan agar sedikit demi sedikit agar tidak menggumpal.
9. Memasak media sambil mengaduk sampai homogen dan mendidih.
10. Memasukkan larutan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml media.
11. Menutup botol dengan plastik dan diikat dengan karet.
12. Memberi label pada masing masing media.



**Gambar 3. Metode Pelaksanaan Pembuatan Media**



1. Alat dan pembuatan media MS



2. Bahan pembuatan media MS



3. Menimbang agar, sukrosa, NaCl sesuai kebutuhan



4. Membuat larutan MS



5. Menambahkan Aquades



6. Membagi menjadi 6 bagian



7. Menambahkan beberapa konsentrasi manitol



8. Mengukur pH (5,6-5,8)



9. Menambahkan agar-agar pada setiap perlakuan



10. Memasak media menggunakan microwave



11. Menuangkan media ke dalam botol



12. Menutup botol dengan plastik



13. Sterilisasi media menggunakan autoklaf

### 3.4.5 Sterilisasi Media Kultur

Proses sterilisasi media kultur yang digunakan adalah sebagai berikut:

1. Memasukkan botol kultur yang telah berisi media ke dalam autoklaf.
2. Mengatur autoklaf dengan suhu 121°C selama 10 menit.
3. Mengambil media dari autoklaf dan mendinginkannya sampai media benar-benar dingin dan padat kemudian memasukkan media ke dalam ruang kultur.
4. Mendinginkan media 5-7 hari untuk mengetahui kontaminasi dari media kultur tersebut.

### 3.4.6 Pengamatan dan Pemeliharaan Eksplan

Penanaman eksplan daun violces dilakukan dalam LAF :

Proses penanaman violces yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Menyiapkan alat (cawan petri, pinset, scalel, gunting, bunsen burner, plastik wrep) dan bahan (alkohol untuk steril pinset, scalpel dan gunting)
2. Memasukkan alat dan bahan ke dalam LAF.
3. Menyalakan lampu UV selama 1 jam sebelum digunakan. Mematikan lampu UV dan menyalakan blower + lampu LAF.
4. Memasukkan media kultur perlakuan dan eksplan kentang ke dalam LAF.
5. Merendam dan membakar pinset dan scalpel blade sebelum digunakan.
6. Mengambil plantlet violces dalam botol dan meletakkan di atas cawan petri. Pemotongan dilakukan dengan cara memotong 1 cm.
7. Menanam eksplan yang sudah dipotong ke dalam media perlakuan.
8. Memanaskan mulut botol dan tutup botol dengan bunsen.

9. Menutup kembali botol menggunakan plastik dan mengikatkan dengan karet.

Melapisi tutup botol dengan plastik wrap untuk meminimalisir kontaminasi.

10. Memberi label perlakuan dan tanggal penanaman.

11. Meletakkan botol di rak kultur.

#### Gambar 4. Inokulasi Tanaman *Violces*



1. Menyiapkan alat dan bahan



2. Menyalakan sinar UV selama 1 jam



3. Memanaskan scalpel Blad dan Pinset



4. Mengeluarkan planlet dari botol



5. Memotong planlet



6. Menanam planlet pada media baru



7. Menutup botol dengan plastik

#### 3.4.7. Inkubasi

Inkubasi dilakukan di ruang kultur dengan kondisi ruang yang steril dengan suhu  $\pm 22^{\circ}\text{C}$  dan pencahayaan lampu 28 watt selama 16 jam penyinaran dan 8 jam masa gelap.



### 3.5 Variabel Pengamatan

Keragaan vegetatif variabel kuantitatif

1. Eksplan Berkalus (%)

Pengamatan di lakukan dengan cara menghitung persentase eksplan berkalus pada tiap sampel. Diamati 3 hari sekali sampai 81 HSI (hari setelah inokulasi).

2. Eksplan Bertunas(%)

Pengamatan di lakukan dengan cara menghitung persentase eksplan bertunas yang muncul pada tiap sampel. Diamati 3 hari sekali sampai 81 HSI (hari setelah inokulasi).

3. Jumlah Tunas

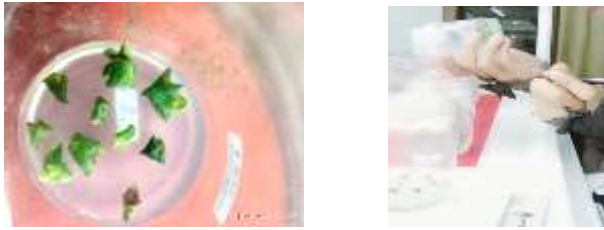
Pengamatan di lakukan dengan cara menghitung jumlah tunas yang muncul pada tiap sampel. Diamati 3 hari sekali sampai 81 HSI (hari setelah inokulasi).

4. Jumlah daun

Pengamatan di lakukan dengan cara menghitung jumlah daun yang muncul pada tiap sampel. diamati 3 hari sekali sampai 81 HSI (hari setelah inokulasi).

5. Eksplan Hidup (%)

Pengamatan di lakukan dengan cara menghitung presentase eksplan hidup yang muncul pada tiap sampel. Diamati 3 hari sekali sampai 81 HSI (hari setelah inokulasi).

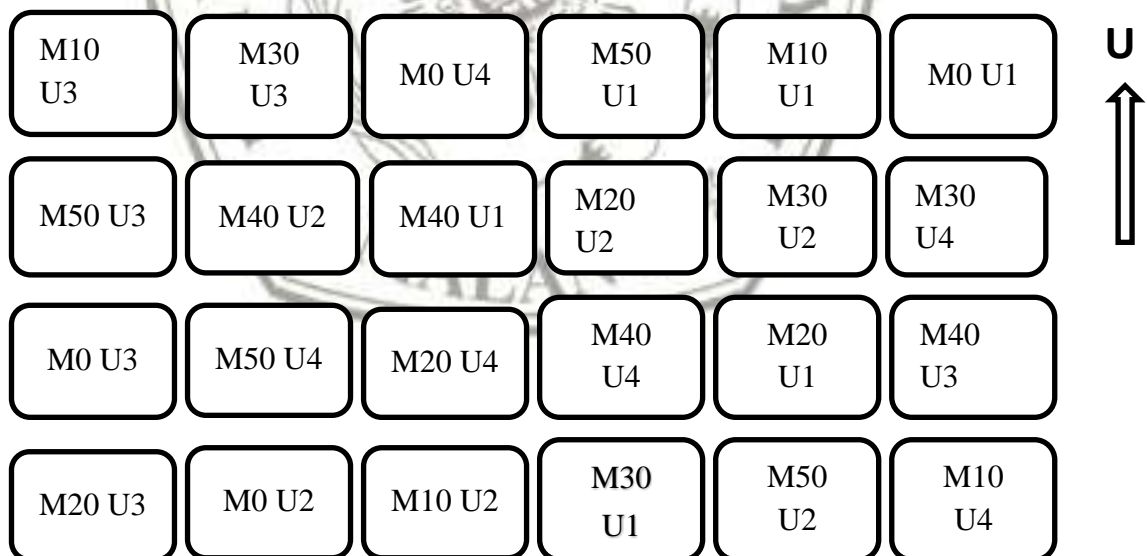


**Gambar 5.** Melakukan Pengamatan

### 3.6 Analisis Data

Data yang didapat dianalisis dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) Sederhana dengan uji F dan uji Duncan untuk mengetahui pengaruh terbaik pada seluruh perlakuan. Untuk analisa statistik data di transformasi arcsin.

### 3.7 Denah Plot Penelitian



Keterangan :

M0	: Manitol 0 g	U 1 = Ulangan 1
M 10	: Manitol 10 g	U2 = Ulangan 2
M 20	: Manitol 20 g	U3 = Ulangan 3
M 30	: Manitol 30 g	U4 = Ulangan 4
M 40	: Manitol 40 g	
M 50	: Manitol 50 g	